

Approved For Release STAT
2009/08/31 :
CIA-RDP88-00904R000100130

Dec

Approved For Release
2009/08/31 :
CIA-RDP88-00904R000100130



Вторая Международная конференция
Организации Объединенных Наций
по применению атомной энергии
в мирных целях

A/CONF/15/P.2239
USSR
ORIGINAL:RUSSIAN

Не подлежит оглашению до официального сообщения на Конференции

АЦЕТИЛИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ СИСТЕМЫ КОЭНЗИМА А ПРИ ЛУЧЕВОЙ
БОЛЕЗНИ

И.Ф.Сейц

В последние годы особенный прогресс в биохимии отмечался в областях, связанных с изучением функции коэнзима А. Открываются все новые стороны обмена веществ, обусловленные участием этого соединения. Выявлена его роль в окислительном катаболизме субстратов, показано участие в генерации, необходимой для функций клеток энергии, установлено важное значение в синтезе самых разнообразных, в том числе весьма сложных клеточных соединений. Хотя функции коэнзима А очерчены еще далеко не полно, есть достаточно оснований считать, что система этого кофермента занимает в обмене веществ одно из центральных мест, что определяется его участием в самых фундаментальных реакциях и процессах, лежащих в основе жизни.

Если значение коэнзима А в нормальном метаболизме клеток и тканей не раскрыто еще во всей полноте, то тем более мы далеки от понимания этих процессов в патологии. Между тем очевидно, что нарушение функций столь важных в обмене веществ компонентов, какими являются коэнзим А и связанные с ним системы, может оказывать решающее влияние на возникновение, течение и исход различных заболеваний.

Большой интерес с этой точки зрения имеет острый лучевой синдром. Все, что известно об этом тяжелом и сложном патологическом состоянии, указывает на серьезные нарушения как в ассимиляторной, так и в диссимиляторной фазах обмена веществ. Расстройства, связанные с лучевым поражением, захватывают как энергетический, так и пластический обмен и вызваны, по-видимому, не только изменениями отдельных реакций и процессов обмена веществ, но и нарушением их координации.

25 YEAR RE-REVIEW

- 2 -

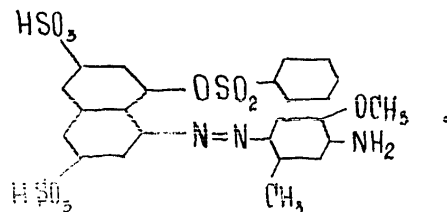
Такое общее воздействие лучистой энергии на живые клетки побуждает искать изменения в факторах, имеющих универсальное значение в жизнедеятельности организмов и выполняющих интегрирующую функцию в обмене веществ. Именно к такого рода агентам относится коэнзим А, связывающий в одно целое различные стороны клеточной активности.

Целью настоящего исследования было изучение влияния облучения целого организма рентгеновыми лучами на активность системы коэнзима А в печени и на сам коэнзим.

Экспериментальная часть

Исследовалась ацетилирующая функция ферментной системы коэнзима А и изменение концентрации коэнзима в печени голубя при острой лучевой болезни, вызванной воздействием лучами Рентгена. Птицы подвергались однократному облучению рентгеновыми лучами в дозе 2-3 тыс.р. На 5-е - 7-е сутки обнаруживались признаки острой лучевой болезни и голуби гибли на 8-й - 9-й день после облучения. Исследования производились на 5-й - 7-й день. К этому моменту у облученных голубей наблюдались падение числа лейкоцитов в периферической крови с примерно 25 тыс. в 1 мм^3 до 2-9 тыс., повышение свертываемости крови, расстройства желудочно-кишечного тракта, потеря аппетита, падение веса.

Ацетилирующая активность проверялась в целых гомогенатах печени (1) и в аутолизированных экстрактах из ацетоновых порошков, полученных из печеночной ткани по методу Каплана-Липмана (2). В качестве акцепторов активируемых ацетильных групп использовались сульфаниламид (САМ) и п-аминобензойная кислота (ПАБК; метод Бреттон-Маршалла в модификации О.Н.Сытинской, см. 3 и 4), п-аминоазобензол ПААБ; 5), 4-амино-1,1'-азобензол-4'-сульфокислый Na (ПААБС) и примененный нами впервые краситель, полученный сочетанием крезидина и ацил-н-кислоты (К):



Последние два вещества удобны тем, что при ацетилировании

29 2596

- 3 -

они теряют окраску (первый — янтарную, второй — малиновую) и могут быть отфотометрированы в трихлоруксусном центрифугате без дальнейшей обработки.

Для получения гомогенатов голуби обескровливались пункцией сердца (бралось 12–16 мл крови), обезглавливались, печень быстро охлаждалась, гомогенизировалась на холоду в 1,5 объема 0,04 М раствора К-фосфатного буфера pH 7,6 (с добавкой KCl и $MgCl_2$, как у Липмана, 1). 1 мл гомогената дополнялся 0,1 мл ацетата Na (0,025 М), 0,1–0,2 мл раствора акцептора, и смесь инкубировалась в сосудах Варбурга 20 мин. при 37° , после чего пробы обрабатывались трихлоруксусной кислотой, и центрифугат анализировался на убыль свободного акцептора. В табл. 1 приведены результаты опытов с гомогенатами при использовании в качестве акцептора САМ.

Таблица 1

Ацетилирование сульфаниламида в гомогенатах печени здоровых и облученных голубей

№ опы- та	Количество лейкоцитов в 1 мм ³ крови	Ацетилиро- валось, γ САМ	№ опы- та	Количество лейко- цитов в 1 мм ³ кро- ви		Ацетили- ровалось, γ САМ
				до облу- чения	в момент исследо- вания	
1	2	3	4	5	6	7
3		540	14			160
6		390	22			145
7		540	31			128
17		490	34			90
18		400	36			54
19		440	37			0
20		340	38			62
26		340	40	25040	6220	104
39	24200	560	44	23760	8400	71
42	25120	420	45	26100	9240	117
43	21560	500	46	21150	5980	160
51	25000	500	49	23600	9400	180
56	27000	530	50	24800	5340	116
57	25600	420	54	21200	5980	220
58	26700	600	61	22200	5220	160
62	24520	180	64	26800	2100	150
67	23700	450	65	20110	1800	107

2596

- 4 -

1	2	3	4	5	6	7
68	23300	620	66	22760	2740	90
69	24030	460	97	22500	2480	107
70	24480	530	99	20900	3280	117
71	21400	510	104	25600	2940	107
			106	24880	14220	180
Среднее		465±16				119±8,5

Исходное количество САМ - 1000 γ . Инкубация 20 мин., температура 37°, цифры в расчете на 1 г сырого веса печени.

Из табл. 1 видно, что ацетилирование САМ в гомогенатах печени облученных голубей значительно заторможено по сравнению с гомогенатами печени контрольных голубей. В первом случае в расчете на 1 г сырой ткани ацетируется 119±8,5 γ САМ, во втором - 465±16. 2396

Аналогичный результат был получен и с другими акцепторами. В табл. 2 представлен ряд опытов с ПААБС и с красителем К.

Таблица 2

Ацетилирование п-аминоазобензолсульфоната и красителя К в гомогенатах печени здоровых и облученных голубей

Ацетилирование в / 1 г ткани/20 мин.	
Контрольные голуби	Облученные голуби
п-аминоазобензолсульфонат	
600	0
960	94
870	95
640	0
460	185
470	210
Краситель К	
150	70
151	71

- 5 -

Весьма отчетливым было также угнетение ацетилирования в гомогенатах печени облученных голубей при использовании в качестве акцепторов ПАБК и ПААБ.

Однозначность опытов, проведенных с различными акцепторами ацетильных групп, позволяла сделать вывод о повреждающем действии рентгеновых лучей на систему коэнзима А в условиях целого организма. Однако поскольку эта система является сложным комплексом, включающим ряд ферментов и коферментов, опыты на целых гомогенатах характеризовали процесс лишь суммарно, но не могли указать, какое именно звено является наиболее уязвимым. Для дальнейшей локализации эффекта облучения производились опыты, в которых к гомогенатам добавлялся избыток коэнзима А (получен в лаборатории) и измерялась максимальная скорость ацетилирования в этих условиях. Добавление избытка коэнзима А к гомогенатам из нормальной печени практически не меняло скорости ацетилирования, тогда как в ферментной системе печени облученных голубей избыток коэнзима увеличивал ацетилирование, хотя и не восстанавливал его до нормы.

Таблица 3

Ацетилирование сульфаниламида в гомогенатах печени здоровых и облученных голубей при избытке коэнзима А (в μ - ацетилированного САМ/1 г ткани/20 мин.)

Контрольные голуби		Облученные голуби	
гомогенат	гомогенат + коэнзим А	гомогенат	гомогенат + коэнзим А
450	450	216	390
630	650	180	532
460	490	160	260
520	560	150	270
510	570	109	230
-	-	90	135

Этот результат, указывая на недостаточность коэнзима А в печени облученных голубей, говорил в то же время и за неполноценность белкового компонента ферментной системы ацетилирования, поскольку избыток коэнзима не восстанавливал ацетилирования полностью. Характерным для этой серии опытов является то, что влияние добавления избытка коэнзима А на ацетилирование в гомогенатах облученных голубей был тем слабее, чем резче были признаки лучевой болезни у птиц и чем сильнее было нарушение ацетилирования в гомогенатах. Это дает основание считать, что в особо острых случаях лучевого поражения ведущей причиной потери ацетилирующей активности в печени является не столько недостаток коэнзима А, сколько повреждение белковой каталитической системы.

Поскольку падение ацетилирующей способности гомогенатов печени облученных голубей, как видно из вышеприведенных опытов, связано с изменениями как в ферментной, так и в коферментной системах, было предпринято изолирование и испытание каждого из этих компонентов в отдельности.

Ферментный компонент системы ацетилирования изучался на аутолизатах экстрактов ацетоновых порошков печени голубя, полученных по методу Каплана-Липмана (2). В результате аутолиза препараты лишаются коэнзима А и без добавления последнего практически оказываются неактивны. Если к такому аутолизату добавлять избыток коэнзима А, то по развиваемому максимальному ацетилированию можно судить о состоянии ферментов активирования и переноса ацетильной группы.

Изучение белкового компонента системы ацетилирования показало, что активность препаратов из печени облученных голубей значительно уступает активности препаратов печени здорового голубя. При дополнении аутолизатов из печени больных голубей избытком коэнзима А никогда не удавалось получить восстановление ацетилирования до уровня контроля. На рис. 1 представлены результаты группы таких опытов.

Следует особо отметить, что ни в одном случае максимальное ацетилирование в ферментной системе из печени больных птиц не достигало даже самого низкого уровня ацетилирования, наблюдавшегося в препаратах из нормальной печени, и тем более не превышало его. Средние данные по всем опытам были следующие: в контрольных

- 7 -

препаратах ацетирировалось $38 \pm 2 - 9 \text{ } \mu\text{M}$ на пробу; в препаратах печени облученных голубей $26 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{M}$.

Эти результаты в совокупности с данными опытов, проведенных на целых гомогенатах при добавлении избытка коэнзима А, позволяют утверждать, что в результате облучения происходит значительное понижение активности ферментов системы ацетирирования, причем это снижение тем значительнее, чем сильнее поражение.

Известно, однако, что процесс ацетирирования осуществляется не одним ферментом, а складывается по крайней мере, из двух реакций, каждая из которых катализируется своим специфическим ферментом (или ферментами). Первый этап - "активация" ацетата - завершается включением ацила уксусной кислоты в состав молекулы коэнзима А и характеризуется увеличением энергетического потенциала ацетирированного деривата коэнзима А до уровня макроэргических соединений; второй этап процесса ацетирирования реализуется в переносе "активированного" ацетата на тот или иной акцептор. В подходящих условиях и при наличии гидроксилamina указанная вторая реакция переноса ацетата может быть осуществлена не ферментативным, а простым химическим путем. Образуется ацетгидроксамова кислота. Этот факт позволил нам отдифференцировать в условиях облучения активность "ацетат-активирующего" фермента от активности "ацетат-транспортирующего" фермента. Сопоставлялись скорость ацетирирования САМ и скорость образования ацетгидроксамова кислоты в гомогенатах печени здоровых и облученных голубей. Было установлено, что в препаратах печени здорового голубя количество микромолей ацетирированного САМ всегда практически равно количеству микромолей образующейся ацетгидроксамова кислоты: $2,6 \pm 0,07 \text{ } \mu\text{M}$ ацетирированного САМ и $2,3 \pm 0,11 \text{ } \mu\text{M}$ ацетгидроксамова кислоты. В то же время в препаратах больных птиц образование ацетгидроксамова кислоты всегда намного превышает ацетирирование САМ: $0,74 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{M}$ ацетирированного САМ и $2,3 \pm 0,13 \text{ } \mu\text{M}$ ацетгидроксамова кислоты.

2596

- 8 -

Таблица 4

Ацетилирование САМ и образование ацетгидроксамовой кислоты в гомогенатах печени здоровых и облученных голубей (в μ молях на 1 пробу за 30 мин.)

Контрольные голуби		Облученные голуби	
ацетили- рование САМ	образование ацетгидрок- самовой кис- лоты	ацетили- рование САМ	образование ацетгидрок- самовой кис- лоты
3,5	3,0	0,5	2,2
1,8	2,0	1,2	2,8
3,0	2,8	1,3	3,5
2,3	1,8	0,3	2,5
1,5	1,9	1,2	2,5
3,7	2,4	0,5	1,8
2,9	2,2	0,7	1,9
2,8	2,2	0,6	1,7
2,8	2,5	0,4	2,0
2,0	2,0	0,7	2,5
Среднее			
2,6 \pm 0,07	2,3 \pm 0,11	0,74 \pm 0,1	2,3 \pm 0,13

Ацетгидроксамовая кислота определялась по методу Липмана (6) в модификации Бейнерта (7).

Поскольку весь процесс ацетилирования состоит из 2 основных этапов, а при облучении птиц отмечается нарушение ацетилирования лишь САМ, но не гидроксидамина, можно сделать вывод, что блокируется не реакция активации ацетата, а реакция последующего переноса ацетата с коэнзима А на акцептор. Это следует из того, что образование ацетгидроксамовой кислоты, первый этап которого, как и в случае САМ, включает ферментативное активирование ацетата и лишь второй независим от фермента, не нарушается в результате облучения.

Таким образом, оказалось возможным точно локализовать место действия облучения на белковый компонент системы ацетилирования.

- 9 -

Наиболее уязвимым звеном является фермент ацетаттиофераза.

Как упоминалось выше, опыты с целыми гомогенатами выявили также недостаточность коэнзима А в печени облученных голубей. В связи с этим была сделана попытка количественно охарактеризовать этот эффект. Из печени здоровых и подвергнутых действию рентгеновых лучей голубей получались прокипяченные экстракты (1 г ткани + +3 объема воды) и определялось содержание в них коэнзима А по стимуляции ими процесса ацетилирования в аутолизированных экстрактах ацетоновых порошков печени голубя. Количество сока, обеспечивающее 50% скорости ацетилирования от максимальной (избыток коэнзима А), соответствовало единице коэнзима (2). Оказалось, что печень здорового голубя содержит количество коэнзима А, соответствующее 100 ед. на 1 г сырого веса ткани, тогда как печень облученных голубей лишь 67 ед. В условиях опытов пятидесятипроцентное активирование ацетилирования вызывалось 0,04+0,002 мл прокипяченного сока нормальной печени и 0,06±0,005 мл сока из больной печени.

Обсуждение результатов

Влияние ионизирующей радиации на активность системы коэнзима А изучалось до настоящего времени недостаточно мало. Относящиеся к этому вопросу работы единичны. А.В.Труфанов и Г.М. Попова (8) показали, что в гомогенатах мозга морских свинок, подвергнутых действию рентгеновых лучей в дозе 500 р, биосинтез коэнзима А резко заторможен. Другой результат был получен Дюбуа и сотр. (9). В их опытах облучение крыс рентгеновыми лучами в дозах 400-800 и даже 1200 р не вызывало изменений в ацетилировании вводимого внутрибрюшинно САМ. Аналогичные данные были получены при облучении морских свинок. Авторы пришли к выводу, что коэнзим А при облучении не страдает. В недавно появившейся работе Е.Ф.Романцева и З.И.Жулановой (10) также отмечается, что облучение крыс рентгеновыми лучами дозой 650 р не приводит к изменению процессов ацетилирования на всем протяжении лучевой болезни. В работе учитывалось выведение свободного и связанного САМ с мочой. Таким образом, вопрос о влиянии облучения на систему коэнзима остается нерешенным.

Проведенные нами опыты по исследованию ацетилирующей способности препаратов из печени здоровых и облученных голубей дают

- 10 -

право утверждать, что ионизирующая радиация оказывает глубокое воздействие на систему переноса ацетильных групп. Можно думать, что эффект рентгеновых лучей на систему коэнзима А играет важную роль в развитии и течении лучевой болезни.

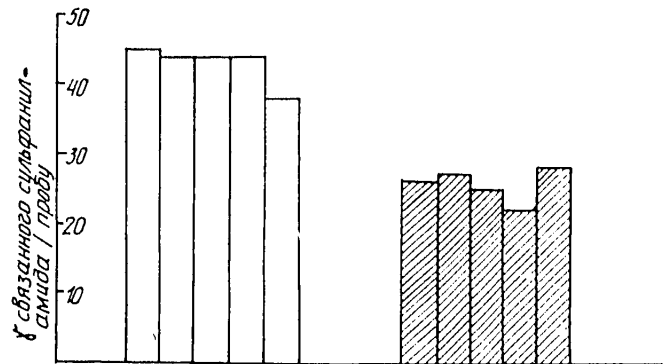
В ы в о д ы

На 6-й - 7-й день после облучения голубей рентгеновыми лучами в дозе 2-3 тыс. р интенсивность процесса ацетилирования в гомогенатах печени птиц падает с $465 \pm 16 \%$ сульфаниламида (1 г сырого веса ткани) 20 мин. до $119 \pm 8,5 \%$. Торможение ацетилирования показано также с другими акцепторами ацетильных групп: п-аминобензойной кислотой, п-аминоазобензолом, п-аминоазобензолсульфонатом, красителем, полученным сочетанием крезидина с ацил-н-кислотой и с гидроксиламином (образование ацетгидроксамовой кислоты). Общий эффект угнетения процесса ацетилирования обусловлен как снижением количества коэнзима А в печени облученных голубей (со 100 ед. на 1 г веса печени в норме до 67 ед. при облучении), так и снижением активности белкового компонента системы. Отмечен параллелизм между тяжестью течения лучевой болезни и степенью уменьшения активности ферментной части системы ацетилирования. Получены данные в пользу того, что действие лучистой энергии локализуется в каталитическом звене, ответственном за перенос ацетильных групп с ацетилкоэнзима А на соответствующий акцептор, т.е. на ферменте ацетотгитоферазе.

Л и т е р а т у р а

1. Lipmann F., J. Biol. Chem., 1946, 162, 743
2. Kaplan N., Lipmann F., J. Biol. Chem., 1948, 174, 37
3. Bratton A.C., Marshall E.K., J. Biol. Chem., 1939, 128, 537
4. Сытинская О.Н., Вопросы мед. хим., 1956, II, в. 3, 214
5. Handschumacher R.E., Mueller G.C., Strong F.M., J. Biol. Chem., 1951, 189, 335
6. Lipmann F., Tuttle L.C., J. Biol. Chem., 1945, 159, 21
7. Beinert H., J. Biol. Chem., 1953, 203, 35
8. Труфанов А.В., Попова Г.М., Биохимия, 1956, 21, № 1, 3
9. Du Bois K.P., Cotten G.J., Petersen D.F., Radiation Research, 1955, 2, № 1, 79
10. Романцев Е.Ф., Жуланова З.И., Биохимия, 1956, 21, № 6, 663

-11-



Максимальная активность ферментной системы ацетилирования из печени здоровых и облученных голубей (при избытке коэнзима А) ферментная система из печени здоровых голубей; ферментная система из печени облученных голубей. Время инкубации 120 мин. температура 37°, аэробно